

脱ガム酵素ホスファチジン酸ホスファターゼの精製と諸特性解析

(福大院・理工*・福大・理工**)

○松井 萌*・藤田 大勢*・佐藤 佑香**・杉森 大助**

1. 緒言

酵素脱ガム法は、従来の物理化学的脱ガム法と比べ低コストかつ低環境負荷であることから海外を中心に普及し始めている。しかし、既存脱ガム酵素はガム質の成分であるホスファチジン酸 (PA) を分解できないことから、PA を効率的に分解できる PA ホスファターゼ (PAP) の開発が強く求められている。また、PAP による PA の分解生成物はバイオディーゼル燃料 (BDF) 製造の原料となるジアシルグリセロール (DAG) であるため、PAP は産業上有用な酵素といえる (Fig. 1)。このような背景のもと、本研究では放線菌由来 PAP に着目し、本酵素の精製と諸特性解析を行った。

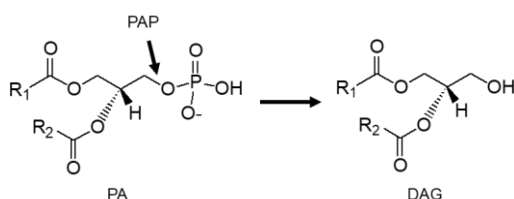


Fig. 1. Hydrolysis of PA by PAP.

2. 方法および結果

2.1 PAP 精製

研究室保有の放線菌ライブラリーのうち 112 株を対象にしたスクリーニングにより、培養上清に PAP を分泌生産する NT-119 株を取得した。NT-119 株の 16S rDNA 塩基配列解析の結果から、本菌株は *Amycolatopsis halotolerans* に近縁の新種 *Amycolatopsis* sp. と帰属された。NT-119 由来 PAP (PAP_{NT119}) の精製工程にパルミトイルセルロースアフィニティークロマトグラフィー (Pal-G) を導入することにより、PAP_{NT119} を電気泳動的に単一とな

るまで精製することに成功した (Fig. 2)。SDS-PAGE 分析の結果、PAP_{NT119} は分子質量 54 kDa のポリペプチド鎖からなる単量体酵素であると推定した。

2.2 諸特性解析

精製酵素サンプルを用いて PAP_{NT119} の諸特性解析を行った結果、PA に対して pH 6.5、45°C で最大活性を示した。基質特異性試験の結果、PA 以外の基質にはほとんど作用しないことから、本酵素は PA に特異的に作用する酵素である。また、PAP_{NT119} は透析によって失活し、10 μ M MnCl₂ 添加によって活性が回復したことから、Mn²⁺ 要求性酵素であると考えられる。1 mM 金属塩を反応液に添加し、金属イオンによる影響を調べたところ、CaCl₂ および NaCl 存在下で活性が約 1.5 倍向上した。現在、精製酵素を用いてさらなる諸特性解析を進めている。

3. 総括

放線菌 *Amycolatopsis* sp. NT-119 由来分泌型 PAP (PAP_{NT119}) を精製し、諸特性解析を行った。PAP_{NT119} は Mn²⁺ 要求性、分子質量 54 kDa であり、pH 6.5、45°C で最大活性を示した。

PAP に関しては、これまでに真核生物由来膜結合型 PAP の報告例が多数ある一方で、原核生物由来分泌型は唯一 *Streptomyces mirabilis* A-2313 由来 PAP (PAP_{A2313}) が報告されているのみである¹⁾。PAP_{A2313} の分子質量は 15 kDa であり、Ca²⁺ 要求性であることなどから、放線菌由来分泌型 PAP としても PAP_{NT119} は新奇酵素で可能性が高いと結論づけた。

1) 東洋醸造株式会社, 新規なホスファチジン酸ホスファターゼの製造法, 特開昭 50-142780 (1975.11.17).

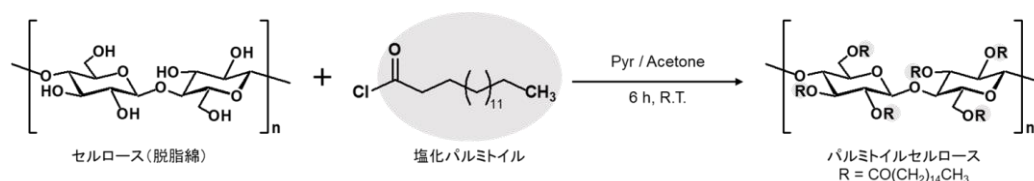


Fig. 2. Synthesis of palmitoyl cellulose (Pal-G).